



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12P 19/32	A1	(11) 国際公開番号 WO98/48031  (43) 国際公開日 1998年10月29日(29.10.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01711</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月15日(15.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/116272 1997年4月18日(18.04.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヤマサ醤油株式会社(YAMASA CORPORATION)[JP/JP] 〒288-0056 千葉県銚子市新生町2-10-1 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 石毛和也(ISHIGE, Kazuya)[JP/JP] 〒314-0253 茨城県鹿島郡波崎町須田2020 Ibaraki, (JP) 野口利忠(NOGUCHI, Toshitada)[JP/JP] 〒288-0812 千葉県銚子市栄町3-1556 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE AND USE THEREOF</p> <p>(54) 発明の名称 アデノシン5'-三リン酸の製造法及びその応用</p> <p>(57) Abstract A process for producing adenosine 5'-triphosphate (ATP) by reacting adenosine 5'-monophosphate (AMP) with a polyphosphate kinase, an adenylate kinase and a polyphosphoric acid. ATP can be easily produced at a low cost by this process.</p>		

(57)要約

本発明は、アデノシン5' - リン酸 (AMP) にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめ、アデノシン5' - 三リン酸 (ATP) を製造する方法に関する。

本発明によれば、簡便かつ安価にATPを製造することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

## 明 細 書

## アデノシン 5' - 三リン酸の製造法及びその応用

## 技術分野

本発明は、アデノシン 5' - リン酸 (AMP) にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめ、アデノシン 5' - 三リン酸 (ATP) を製造する方法及びその応用に関するものである。

## 背景技術

近年の遺伝子操作技術の進展により、さまざまな酵素の安価な大量調製が可能となり、従来、微生物菌体を用いた微生物変換あるいは発酵生産により合成されてきた有用生理活性物質が直接酵素反応により安価に製造することが可能となってきた。

ところで、リン酸化反応、アミノ化反応などの高エネルギーを必要とする酵素反応には、ATP がエネルギー供与体あるいはリン酸供与体として必要である。従来の微生物変換あるいは発酵生産においては、ATP は用いた微生物の生体内より供給されるが、酵素法においては ATP を反応系に添加したり、効率的な ATP の再生系を開発することが不可欠である。現在、ATP は化学合成法あるいは微生物もしくは酵母菌体を用いて AMP もしくはアデニンから合成されている。しかしながら、ATP の安価な合成法は現時点で確立されておらず、市販されている ATP は極めて高価である。また、ATP の再生系としてはホスホクレアチンとホスホクレアチンキナーゼとの組み合わせが実験室レベルで使用されるが、基質、酵素とも極めて高価であるため実用的ではない。また、ポリリン酸キナーゼとポリリン酸の組み合わせも検討されているが、依然高価な ATP あるいは ADP の使用は不可欠であり、実用化には至っていない。

このようにA T Pは極めて高価であるのに対し、A M Pは比較的安価に製造されうる。そのため、A T Pを使用する酵素反応系において、高価なA T Pを添加するのではなく、安価なA M PからA T Pを製造する方法、あるいは消費されたA T Pを効率的に再生する方法の開発が望まれていた。

従って、本発明は高価なA T PをA M Pより効率的に製造または再生する方法を提供することを目的とするものである。

## 発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、ポリリン酸キナーゼが、ポリリン酸の存在下でアデニレートキナーゼと共役することによりA M PからA T Pを合成する活性を有することを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、アデノシン5' - リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめることを特徴とするアデノシン5' - 三リン酸の製造法を提供するものである。

また、本発明は、アデノシン5' - 三リン酸を消費する酵素反応を利用した化合物の製造法において、アデノシン5' - リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめてアデノシン5' - 三リン酸を生成させ、当該酵素反応に供給することを特徴とする当該化合物の製造法を提供するものである。

さらに、本発明は、アデノシン5' - 三リン酸を消費する酵素反応を利用した化合物の製造法において、生成したアデノシン5' - リン酸及び／またはアデノシン5' - 二リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめてアデノシン5' - 三リン酸を再生しながら当該酵素反応を行うことを特徴とする当該化合物の製造法を提供するものである。

さらにまた、本発明は、ポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を組み合わせてなるアデノシン5' - リン酸からアデノシン5' - 三リン酸

ン酸の合成系を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の A T P 合成系における A M P、A D P、A T P の消長を示したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するポリリン酸キナーゼ (E. C. 2. 7. 4. 1) 及びアデニレートキナーゼ (E. C. 2. 7. 4. 3) はいずれも公知の酵素であり、動物由来、植物由来、微生物由来などのものを使用することができる。このうち、酵素の調製の簡便さなどの点から微生物、特に大腸菌由来のポリリン酸キナーゼ及びアデニレートキナーゼが使用に好都合である。また、近年の遺伝子組み換え技術を利用してポリリン酸キナーゼ遺伝子またはアデニレートキナーゼ遺伝子をクローン化し、大腸菌などを宿主としてポリリン酸キナーゼまたはアデニレートキナーゼを大量生産させ、当該組み換え菌より上記 2 種類の酵素をそれぞれ調製することも可能である (J. Biol. Chem., 267, 22556-22561(1992)、Nucleic Acids Res., 13, 7139-7151(1985))。

反応系に添加するポリリン酸キナーゼ及びアデニレートキナーゼは、当該活性を有する限りどのような形態であってもよい。具体的には、微生物の菌体、該菌体の処理物または該処理物から得られる酵素調製物などを例示することができる。微生物の菌体の調製は、当該微生物が生育可能な培地を用い、常法により培養後、遠心分離等で集菌する方法で行うことができる。具体的に、バシラス属または大腸菌類に属する細菌を例に挙げ説明すれば、培地としてはブイヨン培地、L B 培地 (1 % トリプトン、0. 5 % イーストエキス、1 % 食塩) または 2 × Y T 培地 (1. 6 % トリプトン、1 % イーストエキス、0. 5 % 食塩) などを使用することができ、当該培地に種菌を接種後、3 0 ~ 5 0 °C で 1 0 ~ 5 0 時間程度必要に

より攪拌しながら培養し、得られた培養液を遠心分離して微生物菌体を集菌することによりポリリン酸キナーゼ活性またはアデニレートキナーゼ活性を有する微生物菌体を調製することができる。

微生物の菌体処理物としては、上記微生物菌体を機械的破壊（ワーリングブレンダー、フレンチプレス、ホモジナイザー、乳鉢などによる）、凍結融解、自己消化、乾燥（凍結乾燥、風乾などによる）、酵素処理（リゾチームなどによる）、超音波処理、化学処理（酸、アルカリ処理などによる）などの一般的な処理法に従って処理して得られる菌体の破壊物または菌体の細胞壁もしくは細胞膜の変性物を例示することができる。

酵素調製物としては、上記菌体処理物からポリリン酸キナーゼ活性またはアデニレートキナーゼ活性を有する画分を通常の酵素の精製手段（塩析処理、等電点沈殿処理、有機溶媒沈殿処理、透析処理、各種クロマトグラフィー処理など）を施して得られる粗酵素または精製酵素を例示することができる。

本発明で使用するAMPは、市販のものが使用できる。使用濃度としては、例えば1～200mM、好ましくは1～50mMの範囲から適宜設定することができる。また、添加するポリリン酸も市販のものが使用できる。使用濃度としては、例えば無機リン酸に換算して1～1000mM、好ましくは10～100mMの範囲から適宜設定することができる。

ATPの製造法は、例えばpH4～9の範囲の適当な緩衝液中にAMP及びポリリン酸を添加し、さらに0.001ユニット/ml以上、好ましくは0.001～10ユニット/mlのポリリン酸キナーゼ、及び0.01ユニット/ml以上、好ましくは0.01～100ユニット/mlのアデニレートキナーゼを添加し、20℃以上、好ましくは30～40℃で1～50時間程、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

このようにして調製したATPは、公知の方法にて単離精製することができる。

また、ATPを消費する酵素反応を利用した化合物の製造法においては、

AMPに上記ポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめて生成させたATPを当該酵素反応に供給しながら反応を行うことにより、当該化合物を製造することができる。特に、ATPを消費する酵素反応を利用した化合物の製造法においては、当該酵素反応により生じたAMP及び／またはADPを原料としてATPを再生しながら反応を行うことが可能なため、効率的に目的とする化合物を製造することができ、例えば、ガラクトキナーゼを用いたガラクトース-1-リン酸合成系、UMPキナーゼを用いたUDP合成系、コリンキナーゼを用いたホスホコリン合成系などATPを消費するあらゆる酵素反応に応用することができる。

このようなATP合成系と酵素反応との反応条件は、小規模試験にて適宜決定すればよく、また目的化合物の単離精製も公知の方法により行うことができる。

## 実施例

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。また、実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular cloning」(Maniatisら編、Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1982))に従って行った。また、制限酵素、Amp1iTaqDNAポリメラーゼ、T4DNAリガーゼは宝酒造(株)より入手した。さらに、反応液中のヌクレオチド類の定量はHPLC法により行った。具体的には、分離にはYMC社製のODS-AQ312カラムを用い、溶出液として0.5Mリン酸一カリウム溶液を用いた。

### 実施例1；ATPの合成

#### (1) 大腸菌ポリリン酸キナーゼ遺伝子のクローニング

大腸菌K12株JM109菌(宝酒造(株)より入手)の染色体DNAを斉藤と三浦の方法(Biochim. Biophys. Acta., 72, 619(1963))で調製した。この

DNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法により大腸菌ポリリン酸キナーゼ (ppk) 遺伝子を増幅した。

プライマー (A) : 5' -TACCATGGGTCAGGAAAAGCTAT  
A-3'

プライマー (B) : 5' -ATGGATCCTTATTCAGGTTGTTC  
GAGTGA-3'

PCRによるppk遺伝子を増幅は、反応液100  $\mu$ l中 (50 mM 塩化カリウム、10 mM トリス塩酸 (pH 8.3)、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1  $\mu$ g、プライマーDNA (A) (B) 各々0.2  $\mu$ M、AmpliTaq DNAポリメラーゼ 2.5 ユニット) をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性 (94°C、1分)、アニーリング (55°C、1.5分)、ポリメライゼーション (72°C、1.5分) のステップを25回繰り返すことにより行った。

遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献 (Molecular cloning、前述) の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.0 kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素Nco I及びBamH Iで切断し、同じく制限酵素Nco I及びBamH Iで消化したプラスミドpTrc99A (Pharmacia Biotech社より入手) とT4 DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109菌を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrc-PPKを単離した。pTrc-PPKは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNco I-BamH I切断部位に大腸菌ppk遺伝子を含むNco I-BamH I DNA断片が挿入されたものである。



## (2) 大腸菌ポリリン酸キナーゼの調製

プラスミド pTrc-PPK を保持する大腸菌 JM109 菌を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含有する  $2 \times \text{YT}$  培地  $300 \text{ ml}$  に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。 $4 \times 10^8$  菌/ $\text{ml}$  に達した時点で、培養液に終濃度  $1 \text{ mM}$  になるように IPTG を添加し、さらに  $30^\circ\text{C}$  で 5 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 ( $9,000 \times g$ 、10 分) により菌体を回収し、 $60 \text{ ml}$  の緩衝液 ( $50 \text{ mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.5$ )、 $5 \text{ mM}$  EDTA、 $0.1\%$  トライトン X-100、 $0.2 \text{ mg}/\text{ml}$  リゾチーム) に懸濁した。 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間保温した後、超音波処理を行い、菌体を破碎し、さらに遠心分離 ( $20,000 \times g$ 、10 分) により菌体残さを除去した。このように得られた上清画分を  $5 \text{ mM}$  塩化マグネシウム及び  $1 \text{ mM}$  2-メルカプトエタノールを含有する  $50 \text{ mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.8$ ) に対して透析を行い、粗酵素液とした。

粗酵素液におけるポリリン酸キナーゼ比活性は、 $0.19$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質であり、対照菌 (pTrc99A を保持する大腸菌 JM109 菌) の比活性 ( $0.00018$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質) の約  $1000$  倍であった。次に粗酵素液を DEAE トヨパール  $650 \text{ M}$  (トーソー (株)) を用いて  $0 \sim 0.5 \text{ M}$   $\text{NaCl}$  の濃度勾配にて分画し、ポリリン酸キナーゼ画分を得た。この画分をポリリン酸キナーゼ酵素標品とした。なお、この酵素標品におけるポリリン酸キナーゼの比活性は、 $0.6$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質であった。

なお、本発明におけるポリリン酸キナーゼ活性の単位 (ユニット) は、以下に示す方法で測定、算出したものである。すなわち、 $5 \text{ mM}$  塩化マグネシウム、 $100 \text{ mM}$  硫酸、 $5 \text{ mM}$  ADP、及びポリリン酸 (無機リン酸として  $100 \text{ mM}$ ) を含有する  $25 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH} 7.8$ ) に酵素標品を添加して、 $37^\circ\text{C}$  で保温することで反応を行い、 $100^\circ\text{C}$ 、1 分間の熱処理により反応を停止させる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて反応液中の ATP を定量し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 分間に  $1 \mu\text{mole}$  の ATP を生成する活性を 1 単位 (ユニット) とす

る。

### (3) 大腸菌アデニレートキナーゼのクローニング

大腸菌 K12 株 JM109 菌 (宝酒造 (株) より入手) の染色体 DNA を斉藤と三浦の方法 (Biochim. Biophys. Acta., 72, 619(1963)) で調製した。この DNA をテンプレートとして、以下に示す 2 種類のプライマー DNA を常法に従って合成し、PCR 法により大腸菌アデニレートキナーゼ (adk) 遺伝子を増幅した。

プライマー (A) : 5' - ATGGATCCCGTTTCAGCCCCAGG  
TGCC - 3'

プライマー (B) : 5' - ATAAGCTTGGCCTGAGATTGCTG  
ATAAG - 3'

PCR による adk 遺伝子の増幅は、反応液 100  $\mu$ l 中 (50 mM 塩化カリウム、10 mM トリス塩酸 (pH 8.3)、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレート DNA 0.1  $\mu$ g、プライマー DNA (A) (B) 各々 0.1  $\mu$ M、AmpliTaq DNA ポリメラーゼ 2.5 ユニット) を Perkin-Elmer Cetus Instrument 社製 DNA Thermal Cycler を用いて、熱変性 (94°C、1 分)、アニーリング (56°C、1.0 分)、ポリメライゼーション (72°C、3.0 分) のステップを 25 回繰り返すことにより行った。

遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に 2 倍容のエタノールを添加し DNA を沈殿させた。沈殿回収した DNA を文献 (Molecular cloning、前述) の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.0 kb 相当の DNA 断片を精製した。該 DNA を制限酵素 BamHI 及び HindIII で切断し、同じく制限酵素 BamHI 及び HindIII で消化したプラスミド pUC18 (宝酒造 (株) より入手) と T4 DNA リガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌 JM109 菌

を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド pUC-ADK を単離した。pUC-ADK は、pUC18 の lac プロモーター下流の BamHI-HindIII 切断部位に大腸菌 adk 遺伝子を含有する BamHI-HindIII DNA 断片が挿入されたものである。

#### (4) 大腸菌アデニレートキナーゼの調製

プラスミド pUC-ADK を保持する大腸菌 JM109 菌を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含有する  $2 \times \text{YT}$  培地  $300 \text{ ml}$  に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。 $4 \times 10^8$  菌/ $\text{ml}$  に達した時点で、培養液に終濃度  $1 \text{ mM}$  になるように IPTG を添加し、さらに  $30^\circ\text{C}$  で 5 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 ( $9,000 \times g$ 、10 分) により菌体を回収し、 $60 \text{ ml}$  の緩衝液 ( $50 \text{ mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.5$ )、 $5 \text{ mM}$  EDTA、 $0.1\%$  トライトン X-100、 $0.2 \text{ mg}/\text{ml}$  リゾチーム) に懸濁した。 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間保温した後、超音波処理を行い、菌体を破碎し、さらに遠心分離 ( $20,000 \times g$ 、10 分) により菌体残さを除去した。

このように得られた上清画分を  $5 \text{ mM}$  塩化マグネシウム及び  $1 \text{ mM}$  2-メルカプトエタノールを含有する  $50 \text{ mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.8$ ) に対して透析を行い、粗酵素液とした。粗酵素液におけるアデニレートキナーゼの比活性は、 $134$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質であり、対照菌 (pUC18 を保持する大腸菌 JM109 菌) の比活性 ( $1.9$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質) の約  $85$  倍であった。次に粗酵素液を DEAE トヨパール  $650 \text{ M}$  (トーソー (株)) を用いて  $0 \sim 0.5 \text{ M}$  NaCl の濃度勾配にて分画し、アデニレートキナーゼ活性のある画分を回収した。この画分をアデニレートキナーゼ酵素標品とした。なお、この酵素標品におけるポリリン酸キナーゼの比活性は、 $344$  ユニット/ $\text{mg}$  蛋白質であった。

なお、本発明におけるアデニレートキナーゼ活性の単位 (ユニット) も次の方法で測定、算出した。すなわち、 $5 \text{ mM}$  塩化マグネシウム、 $5 \text{ mM}$  ATP、及び  $5 \text{ mM}$  AMP を含有する  $50 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH} 7.8$ ) に酵素標品を添加し

て 37℃で保温することで反応を行い、100℃、1分間の熱処理により反応を停止させる。HPLCを用いて反応液中のADPを定量し、37℃で1分間に2  $\mu\text{mol}$  eのADPを生成する活性を1単位（ユニット）とする。

（5）ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによるATPの合成（その1）

10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 硫酸アンモニウム、ポリリン酸（無機リン酸として75 mM）、4 mM AMPを含有する50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.8）に酵素標品あるいは菌体抽出液を添加し、37℃で150分保温した。反応終了後反応液中のヌクレオチドをHPLCを用いて定量した。その結果を表1に示す。

表 1

添加酵素標品	ATP(mM)	ADP(mM)
PPK画分(0.02ユニット/ml)	<0.01	<0.01
ADK画分(0.2ユニット/ml)	<0.01	<0.01
PPK画分(0.02ユニット/ml)+ADK画分(0.2ユニット/ml)	2.58	1.82
PPK画分(0.02ユニット/ml)+ADK画分(0.02ユニット/ml)	0.78	1.11
PPK画分(0.02ユニット/ml)+JM109[pUC18]粗抽出液(2 $\mu$ g/ml)	<0.01	<0.01
PPK画分(0.02ユニット/ml)+JM109[pUC-ADK]粗抽出液(2 $\mu$ g/ml)	0.20	1.37

PPK: ポリリン酸キナーゼ、ADK: アデニレートキナーゼ

表 1 に示すように、ポリリン酸キナーゼ並びにアデニレートキナーゼそれぞれ単独では AMP をリン酸化し、ADP 及び ATP を生成する活性は存在せず、両者が同時に存在することで初めて AMP のリン酸化が生じた。また、通常の大腸菌 (JM109 [pUC18]) より調製した粗酵素液とポリリン酸キナーゼを混合しても AMP のリン酸化は生じないが、アデニレートキナーゼ高生産株 (JM109 [pUC-ADK]) より調製した粗酵素液をポリリン酸キナーゼと混合すると顕著な AMP のリン酸化反応が生じた。以上のことからポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼが共存することで AMP のリン酸化が生じることは明らかである。

(6) ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによる ATP の合成 (その 2)

10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 硫酸アンモニウム、ポリリン酸 (無機リン酸としてそれぞれ 0 mM、30 mM、75 mM、150 mM)、4 mM AMP を含有する 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) に 0.1 ユニット/㎖ ポリリン酸キナーゼ及び 0.5 ユニット/㎖ アデニレートキナーゼを添加し、37℃で 120 分保温した。反応終了後反応液中のヌクレオチドを HPLC を用いて定量した。その結果を表 2 に示す。

表 2

ポリリン酸濃度 (リン酸として)	ATP (mM)	ADP (mM)
0mM	<0.01	<0.01
30	0.37	0.76
75	0.67	1.52
150	<0.01	0.09

表 2 に示すように、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによるリン酸化活性はポリリン酸濃度に依存しているが、高濃度ポリリン酸存在下ではその活性も阻害された。

## (7) ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによるATPの合成(その3)

10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 硫酸アンモニウム、ポリリン酸(無機リン酸として75 mM)、4 mM AMPを含有する50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に0.1 ユニット/ $ml$ ポリリン酸キナーゼ及び様々な濃度のアデニレートキナーゼ酵素標品を添加し、37°Cで70分保温した。反応終了後反応液中のヌクレオチドをHPLCを用いて定量した。その結果を表3に示す。

表 3

ポリリン酸キナーゼ	アデニレートキナーゼ	ATP(mM)	ADP(mM)
0.10 ユニット/ $ml$	0.05 ユニット/ $ml$	0.18	0.14
0.10	0.25	0.85	1.16
0.10	0.50	0.89	1.26
0.10	2.50	1.04	1.20

## (8) ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによるATPの合成(その4)

10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 硫酸アンモニウム、ポリリン酸(無機リン酸として75 mM)、4 mM AMPを含有する50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に0.1 ユニット/ $ml$ ポリリン酸キナーゼ及び2.5 ユニット/ $ml$ アデニレートキナーゼ酵素標品を添加し、37°Cで400分保温した。反応終了後反応液中のヌクレオチドをHPLCを用いて定量した。その結果を図1に示す。反応終了時の反応液中のヌクレオチド濃度は、ATP 2.3 mM、ADP 1.3 mM、AMP 0.4 mMであった。

## 実施例2 ; ATP再生系を利用したガラクトース-1-リン酸の製造

## (1) 大腸菌ガラクトキナーゼの調製

大腸菌ガラクトキナーゼ遺伝子を含有するプラスミドpDR540 (Gene, 20, 231(1982)、ファルマシア社より入手)を保持する大腸菌JM109菌を、100  $\mu g/ml$ のアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地 300  $ml$ に植菌し、

37℃で振とう培養した。4 × 10<sup>8</sup> 菌/mlに達した時点で、培養液に終濃度 1 mMになるようにIPTGを添加し、さらに30℃で5時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000 × g、10分)により菌体を回収し、60 mlの緩衝液(50 mM トリス塩酸(pH 7.5)、5 mM EDTA、0.1% トライトンX-100、0.2 mg/ml リゾチーム)に懸濁した。37℃で1時間保温した後、超音波処理を行い、菌体を破碎し、さらに遠心分離(20,000 × g、10分)により菌体残さを除去した。このように得られた上清画分を5 mM 塩化マグネシウム及び1 mM 2-メルカプトエタノールを含有する50 mM トリス塩酸(pH 7.8)に対して透析を行い、ガラクトキナーゼ酵素液とした。酵素液におけるガラクトキナーゼの比活性は、1.39 ユニット/mg蛋白質であった。

なお、ガラクトキナーゼ活性の単位(ユニット)は、以下に示す方法で測定、算出したものである。5 mM 塩化マグネシウム、10 mM ATP、10 mM ガラクトースを含有する100 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に酵素標品を添加して、37℃で保温することで反応を行い、100℃、1分間の熱処理により反応を停止させる。糖分析装置(ダイオネックス社)を用いて反応液中のガラクトース-1-リン酸を定量し、37℃で1分間に1 μmol eのガラクトース-1-リン酸を生成する活性を1単位(ユニット)とする。

## (2) ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼによるATP再生とガラクトキナーゼによるガラクトース-1-リン酸の合成

10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 硫酸、ポリリン酸(無機リン酸として75 mM)及び4 mM AMPを含有する100 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に0.1 ユニット/ml ポリリン酸キナーゼ及び2.5 ユニット/ml アデニレートキナーゼ酵素標品を添加し、37℃で120分保温した。該AMPリン酸化反応終了時の反応液中のヌクレオチド濃度は、ATP 1.4 mM、ADP 1.7 mM、AMP 0.9 mMであった。この反応液に終濃度40 mMとなるようにD(+)ガラクトースを添加し、さらに1.0 ユニット/mlとなるようにガラクトキナーゼ



を添加し、37℃で4.5時間保温した。反応終了液を糖分析装置（ダイオネックス社）を用いて分析したところ、28.4 mMのガラクトース-1-リン酸の生成が確認された。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、簡便かつ安価にAMPからATPを製造することが可能となった。このATP合成系をATPを消費する酵素反応系と組み合わせることにより、効率的に目的とする化合物を製造することが可能となった。

## 請 求 の 範 囲

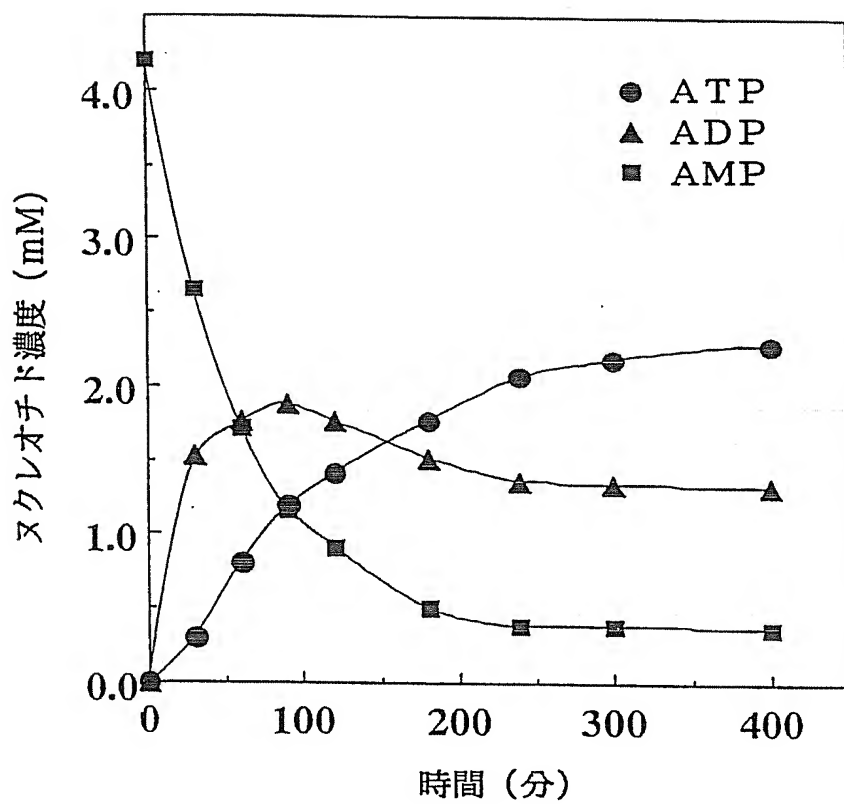
1. アデノシン 5' - 一リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめることを特徴とするアデノシン 5' - 三リン酸の製造法。

2. アデノシン 5' - 三リン酸を消費する酵素反応を利用した化合物の製造法において、アデノシン 5' - 一リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめてアデノシン 5' - 三リン酸を生成させ、当該酵素反応に供給することを特徴とする当該化合物の製造法。

3. アデノシン 5' - 三リン酸を消費する酵素反応を利用した化合物の製造法において、生成したアデノシン 5' - 一リン酸及び／またはアデノシン 5' - 二リン酸にポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を作用せしめてアデノシン 5' - 三リン酸を再生しながら当該酵素反応を行うことを特徴とする当該化合物の製造法。

4. ポリリン酸キナーゼ、アデニレートキナーゼ及びポリリン酸を組み合わせるアデノシン 5' - 一リン酸からアデノシン 5' - 三リン酸の合成系。

図 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12P19/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12P19/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 48-82087, A (The Institute of Physical and Chemical Research), November 2, 1973 (02. 11. 73) (Family: none)	1-4
Y	JP, 57-166992, A (Seitetsu Kagaku Kogyo Co., Ltd.), October 14, 1982 (14. 10. 82) (Family: none)	1-4
Y	JP, 59-106296, A (Kazutomo Imahori), June 19, 1984 (19. 06. 84) & EP, 86053, A & US, 4572894, A	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
July 1, 1998 (01. 07. 98)Date of mailing of the international search report  
July 14, 1998 (14. 07. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>o</sup> C12P19/32

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>o</sup> C12P19/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 48-82087, A (理化学研究所), 2.11月.1973 (02.11.73) (ファミリーなし)	1~4
Y	J P, 57-166992, A (製鉄化学工業株式会社) 14.10月.1982 (14.10.82) (ファミリーなし)	1~4
Y	J P, 59-106296, A (今堀和友), 19.6月.1984 (19.06.84) & EP, 86053, A & US, 457289 4, A	1~4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
01.07.98

国際調査報告の発送日  
14.07.98

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
谷口 博  
4 B 7432  
電話番号 03-3581-1101 内線 3448